

10/535430

JC06 Rec'd PCT/PTO 19 MAY 2005

PATENT

Docket No.: 1169-035

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of

Maria-Elena FERREIRA et al.

U.S. Patent Application No. *Unassigned as yet*

Filed: *Herewith*

:  
:  
:  
:  
:  
:

*Confirmation No. Unassigned as yet*

*Group Art Unit: Unassigned as yet*

*Examiner: Unassigned as yet*

For: USE OF CANTHIN-6-ONE, PLANT EXTRACTS CONTAINING SAME AND  
DERIVATIVES THEREOF IN THE TREATMENT OF TRYPANOSOMIASIS

**CLAIM OF PRIORITY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicants hereby claim the priority  
of *France PCT/FR2003/003459 filed November 24, 2003*, and under 35 U.S.C. 119, Applicants  
hereby claim the priority of *France Patent Application No. 02 14729 filed November 25, 2002*.

Respectfully submitted,

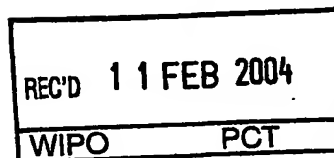
**LOWE HAUPTMAN & BERNER, LLP**



William E. Beaumont  
Registration No. 30,996

1700 Diagonal Road, Suite 310  
Alexandria, Virginia 22314  
(703) 684-1111 WEB/sj  
Facsimile: (703) 518-5499  
**Date: May 19, 2005**

10/535430



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 NOV. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



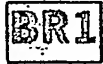
26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 - 00 - 219502

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>25 NOV 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0214729</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>25 NOV. 2002</b> PAR L'INPI		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  Cabinet Ores 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) : VCama-F785/5FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2</b> NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale Transformation d'une demande de brevet européen (Demande de brevet initiale)		Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N° _____ Date _____ N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
<b>3</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE LA CANTHIN-6-ONE, DES EXTRAITS DE PLANTES LA CONTENANT ET DE SES DERIVES DANS LE TRAITEMENT DE LA MALADIE DE CHAGAS.			
<b>4</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5</b> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT Etablissement Public 213, rue La Fayette [7 5 4 8 0] PARIS Cedex 10 FRANCE FRANCE N° de télécopie (facultatif) _____ <input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES DATE <b>26 NOV 2002</b> LIEU <b>INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0214729</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b> Nom Prénom Cabinet ou Société  N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel  Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		ORES Béatrice CABINET ORES  6, avenue de Messine 75 008 PARIS 0145627500 0145620486 ores@cabinet-ores.com
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé
Paiement échelonné de la redevance (condamnations)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes		1
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR - DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) ORES Béatrice 92-4046		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  C. TRAN



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 94 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

BR/SUITE

Réservé à l'INPI

REMLISE DES PIÈCES

DATE 5 NOV 2002

UP 71 INPI PARIS

N° DE DÉPÔT

0214729

NATIONAL ÉTABLI PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

CS 822 1 W / 019702

Vos références pour ce dossier (obligatoire)		VCama-F785/5FR
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE NATIONALE D'ASUNCION
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement Public
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Domicile ou siège	Rue	Rio de la Plata y la gerenza
	Code postal et ville	10000 ASUNCION
	Pays	PARAGUAY
Nationalité		PARAGUAY
N° de téléphone (obligatoire)		
N° de télécopie (obligatoire)		
Adresse électronique (obligatoire)		
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (obligatoire)		
N° de télécopie (obligatoire)		
Adresse électronique (obligatoire)		
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  C. TRAN

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

L'invention a pour objet l'utilisation de la canthin-6-one, des extraits de plantes la contenant et de certains de ses dérivés pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des trypanosomiasés, en particulier au traitement de la maladie de Chagas.

5 En Amérique Latine, environ 90 millions de personnes vivent dans des régions où la maladie de Chagas est endémique. Environ 18 à 20 millions de personnes sont déjà infectées par l'agent responsable de cette maladie : *Trypanozoma (Schizotrypanum) cruzi*.

10 Les traitements chimiothérapeutiques de cette maladie reposent à ce jour sur deux familles de molécules : les nitrofuranes, comme par exemple le nifurtimox, et les nitroimidazoles, comme par exemple le benznidazole. Ces composés peuvent avoir une efficacité sur la maladie de Chagas au début de l'infection, mais ils en ont peu ou pas du tout sur cette maladie lorsque *Trypanosoma cruzi* s'est installé dans l'organisme et que la maladie a pris un caractère chronique.

15 A ce stade, cette maladie est considérée à ce jour comme incurable.

Les traitements au nifurtimox et au benznidazole sont en outre confrontés à l'apparition de souches résistantes de *Trypanosoma cruzi*, ce qui diminue encore leur efficacité dans la phase première de la maladie de Chagas. Enfin, ces deux molécules ont des effets secondaires non négligeables tels que l'anorexie, les vomissements, la neuropathie périphérique et la dermatopathie allergique.

20 Le besoin se faisait donc sentir d'un traitement de la maladie de Chagas qui soit efficace tant dans la première phase de la maladie, où *Trypanosoma cruzi* est présent essentiellement dans le sang, que dans la seconde phase de cette maladie, où l'on trouve *Trypanosoma cruzi* essentiellement dans les organes : cœur, système digestif.

25 La canthin-6-one est un composé connu qui a été isolé à partir de plantes telles que : *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) par Ohmoto *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 1976, 24, 1532-1536 ; *Brucea antidysenterica* (Simaroubaceae) par Fukamiya *et al.*, Planta Med., 1987, 53, 140-143 ; *Eurycoma harmandiana* (Simaroubaceae) par Kachanapoom *et al.*, Phytochemistry, 2001, 56, 383-386 ; *Peganum nigellastrum* (Zygophyllaceae) par Ma  
30 *et al.*, Phytochemistry, 2000, 53, 1075-1078.

La canthin-6-one a été identifiée dans un extrait de *Zanthoxylum elephantiasis* (Rutaceae) par Mitscher *et al.*, Lloydia, 1972, 35, 177-180.

Des activités thérapeutiques de la canthin-6-one ou d'extraits végétaux la contenant ont été rapportées dans les indications suivantes :

35 le traitement de la malaria par Kordonno *et al.*, J. Nat. Prod., 1991, 54(5), 1360-1367 ; comme agent antitumoral, par Fukamiya *et al.*, Planta Med., 1987, 53(2), 140-143 ; comme agent antifongique par Mitscher *et al.*, Lloydia, 1972, 35(2), 177-180.

*Zanthoxylum chiloperone*, d'où l'on a extrait la canthin-6-one pour la mise en œuvre de l'invention, est connu pour son utilisation en médecine traditionnelle comme antiinflammatoire, comme antipyrétique, contre les rhumatismes et comme antiparasitaire général.

5                    Toutefois, rien dans l'art antérieur ne laissait supposer que la canthin-6-one était susceptible de constituer un traitement de la maladie de Chagas, tant dans sa phase première ou aiguë que dans sa phase chronique.

                    L'invention a donc pour objet l'utilisation de la canthin-6-one, d'extraits de plante la contenant et de certains de ses dérivés qui seront définis ci-dessous pour la  
10                   fabrication d'un médicament destiné au traitement des trypanosomiasés, en particulier le traitement de la maladie de Chagas.

                    La canthin-6-one a été isolée à partir de l'écorce du tronc d'une rutacée identifiée comme *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*.

                    Cette plante a été récoltée au Paraguay, près de Piribebuy dans le  
15                   département de Cordillera. Un exemplaire de cette plante a été enregistré auprès de l'Herbarium de la Faculté de Chimie d'Asuncion au Paraguay sous le numéro AF917.

                    Par un procédé qui sera décrit ci-dessous ont été isolés plusieurs extraits de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. On a également isolé la canthin-6-one elle-même à partir de cette plante. Toutefois on peut également mettre en œuvre  
20                   l'invention à partir de canthin-6-one isolée des autres plantes qui la contiennent et qui ont été énumérées plus haut. On peut également utiliser des extraits de *Ailanthus altissima*, de *Brucea antidysenterica*, d'*Eurycoma harmandiana*, de *Peganum nigellastrum* ou de *Zanthoxylum elephantiasis* la contenant pour mettre en œuvre l'invention.

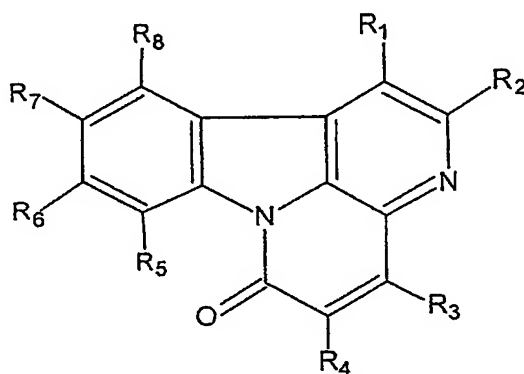
                    Selon un mode préféré de réalisation de l'invention les extraits de  
25                   *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* et l'isolement de la canthin-6-one ont été réalisés suivant un procédé comportant une première étape qui consiste à broyer les écorces séchées du tronc de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* puis à les traiter par une solution alcaline aqueuse, comme par exemple par une solution aqueuse d'ammoniaque.

30                    Le mélange obtenu est extrait par un solvant organique chloré comme par exemple du dichlorométhane.

                    La canthin-6-one peut ensuite être isolée et purifiée par des moyens bien connus de l'homme du métier tels que l'extraction, le lavage, la chromatographie, la précipitation, la recristallisation.

35                    Le même procédé ou un procédé analogue peut être utilisé sur d'autres plantes contenant la canthin-6-one pour en obtenir des extraits comprenant la canthin-6-one ou pour isoler ce composé.

D'autres composés dérivés de la canthin-6-one peuvent être isolés des plantes citées ci-dessus par des méthodes analogues. On peut également préparer des dérivés de la canthin-6-one par des méthodes de synthèses bien connues de l'homme du métier en utilisant comme produit de départ la canthin-6-one ou tout autre composé approprié. En particulier, l'invention concerne les dérivés répondant à la formule (I) ci-dessous :



(I)

- dans laquelle  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$  représentent indépendamment l'un de l'autre :
- un atome d'hydrogène,
  - un groupement alkyle en  $C_1-C_{12}$  linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,
  - un atome d'halogène choisi parmi le chlore, le fluor, le brome et l'iode,
  - un groupement halogénoalkyle en  $C_1-C_{12}$  dont la chaîne alkyle peut être linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée, et le ou les atomes d'halogène sont choisis parmi le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
  - une fonction hydroxyle,
  - une fonction nitro -NO
  - une fonction cyano -CN
  - une fonction -SH
  - une fonction acide carboxylique -COOH
  - une fonction amide -CONH<sub>2</sub>
  - une fonction amine -NH<sub>2</sub>
  - une fonction alcoxy en  $C_1-C_{12}$  dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,

- une fonction ester d'alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé
- une fonction alkyl amide secondaire ou tertiaire dans laquelle le ou les groupements alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés,
- une fonction alkylamine secondaire ou tertiaire dans laquelle le ou les groupements alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés,
- une fonction alkylthio en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé.

La canthin-6-one correspond à la formule (I) dans laquelle :



On connaît deux formes de trypanosomiasés, l'une est causée par l'agent *Trypanosoma brucei* et est plus connue sous le nom de maladie du sommeil, l'autre est causée par l'agent *Trypanosoma cruzi* et est connue comme la maladie de Chagas. L'invention s'intéresse préférentiellement à la préparation d'un traitement efficace contre *Trypanosoma cruzi*.

La canthin-6-one a montré dans les tests d'activité qui sont exposés en détail ci-dessous une efficacité étonnante contre *Trypanosoma cruzi*, en particulier à des doses dix fois plus faibles que les doses auxquelles le benznidazole est efficace.

Selon l'invention, la canthin-6-one, des extraits de plantes la contenant, ou des dérivés de la canthin-6-one, seront mis en œuvre pour traiter des individus infectés par une typanosomiase, en particulier pour traiter des individus infectés par *Trypanosoma cruzi*, à une dose comprise entre 0,01 et 100 mg/kg/j de canthin-6-one ou d'un dérivé, de préférence entre 0,1 et 50 mg/kg/j, encore plus préférentiellement entre 1 et 20 mg/kg/j.

Avantageusement, le traitement sera formulé sous forme de doses quotidiennes comprenant de 0,2 mg à 1 g de canthin-6-one ou d'un dérivé, préférentiellement de 2 à 500 mg, encore plus préférentiellement de 5 à 200 mg.

La canthin-6-one, les extraits de plantes la contenant et ses dérivés peuvent être administrés par voie orale ou parentérale, associés à tout véhicule pharmaceutique approprié. Préférentiellement, la canthin-6-one est administrée par voie orale.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants destinés à l'illustrer.

## EXEMPLES :

5

### Matériel et méthodes

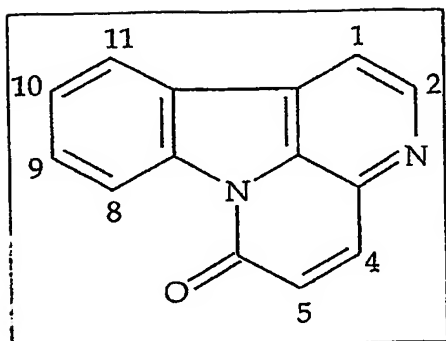
Les spectres UV ont été obtenus sur un spectromètre Philips PU 8720. Les spectres IR ont été mesurés sur un spectromètre Perkin-Elmer 257 dans des pastilles de KBr. Les spectres NMR  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ont été obtenus sur un appareil Bruker AC-200 or AC-400 à une fréquence de respectivement 200 et 50 MHz ou de 400 et 100 MHz, respectively. Les EIMS et CIMS (méthane) ont été mesurés sur un spectromètre Nermag R10-10C. La CLHP semi-préparative a été faite à l'aide d'un détecteur Waters 590 relié à un enregistreur ABB SE 120, avec un système Millipore-Waters (Milford MA, USA) équipé d'une pompe 590, d'un injecteur SSV, et d'une colonne Prepak 1000 Millipore  $\text{C}_{18}$ .

### Exemple 1 : Isolement de la canthin-6-one et de la 5-méthoxy-canthin-6-one :

20 Le procédé d'extraction des écorces de *Zanthoxylum chiloperone* est représenté sur la figure 1 :

L'écorce séchée du tronc de *Zanthoxylum chiloperone* (1,9 kg) est traitée au dichlorométhane dans un appareil Soxhlet pour donner, après évaporation du solvant 44g d'extrait de plante. Cet extrait est redissout puis purifié par chromatographie flash sur 25 colonne de silice en utilisant un mélange acétate d'éthyle/dichlorométhane (8 : 2) comme éluant. On récupère 9 fractions de 250 ml chacune, numérotées 1 à 9 dans l'ordre d'élution. Les fractions  $f_3$  à  $f_5$  sont combinées pour donner 3,2 g de la canthin-6-one après évaporation des solvants et cristallisation dans l'acétone.

30 La fraction  $f_6$  est purifiée par CLHP préparative en utilisant comme solvant un mélange de méthanol et d'eau (7 : 3) pour donner 150 mg de 5-méthoxy-canthin-6-one après cristallisation dans l'acétone.



Canthin-6-one

$C_{14}H_8N_2O$  : 220

La canthin-6-one cristallise dans l'acétone sous forme d'aiguilles jaune

5 pâle.

Le point de fusion (PF), déterminé sur banc de Köfler, est de 162°C.

Spectre UV : MeOH  $\lambda_{max}$  nm (log  $\epsilon$ ) (dans le MeOH à 0,05g/l) : 225 (1,70), 251 (1,35), 260 (1,40), 268 (1,40), 362 (1,33), 379 (1,29) ; (+ HCl 0,5N) : 225 (Non déterminable), 266 (1,49), 273 (1,49), 304 (1,56), 360 ; (+ NaOH 1N) : 225 (Non déterminable), 251 (1,54), 259 (1,55), 267 (1,50), 362 (1,33), 379 (1,29).

Spectre IR : 1665, 1630  $cm^{-1}$

Spectre RMN  $^1H$  : 400 MHz ( $CDCl_3$ ) \_ ppm : 6,90 (d, 1H,  $J = 9,8$  Hz,  $H_5$ ) ; 7,50 (td, 1H,  $J = 8,5$  ; 7,5 et 1 Hz,  $H_{10}$ ) ; 7,70 (td, 1H,  $J = 8,2$  ; 8,5 et 1 Hz,  $H_9$ ) ; 7,90 (d, 1H,  $J = 5$  Hz,  $H_1$ ) ; 8,00 (d, 1H,  $J = 9,8$  Hz,  $H_4$ ) ; 8,10 (dt, 1H,  $J = 7,5$  et 1 Hz,  $H_{11}$ ) ; 8,65 (dt, 1H,  $J = 8,2$  et 1 Hz,  $H_8$ ) ; 8,80 (d, 1H,  $J = 5$  Hz,  $H_2$ ).

Spectre RMN  $^{13}C$  : 50MHz ( $CDCl_3$ ) \_ ppm : 116,4 ( $C_1H$ ), 117,2 ( $C_8H$ ), 122,6 ( $C_{11}H$ ), 124,3 ( $C_{12}$ ), 125,7 ( $C_{10}H$ ), 129,0 ( $C_5H$ ), 130,1 ( $C_{13}$ ), 130,7 ( $C_9H$ ), 131,9 ( $C_{14}$ ), 136,2 ( $C_{3a}$ ), 139,3 ( $C_{7a}$ ), 139,6 ( $C_4H$ ), 145,9 ( $C_2H$ ), 159,0 ( $C_6$ ).

Spectre de masse : [fragment ion]  $m/z$  (%) [ $M+Na$ ] $^{+}$  243 (100%)

20

Analyse élémentaire : C : 76,42 ; H : 3,68 ; N : 12,86 %.

### Exemple 2 : Méthodologie des essais *in vivo* sur *Trypanosoma cruzi* :

Animaux et parasites : Les souris de type Pearl Bright sont élevées dans l'animalerie de l'Institut d'Investigations des Sciences Médicales (IICS, Asuncion, Paraguay) et sont âgées de 6 à 8 semaines lors des protocoles expérimentaux.

Pour ces essais, la souche CL (clône Brener) de *T. cruzi* est employée sous la forme circulante du parasite (trypomastigotes). Les animaux sont infectés par voie intrapéritonéale avec 5000 parasites, cette souche produit son pic de parasites 21 à 25 jours après l'infection. Chaque semaine le nombre de parasites est contrôlé par prélèvement sanguin au niveau de la queue de la souris.

Infection et traitement : Les traitements avec le benznidazole, le médicament de référence et la canthin-6-one débutent 11 jours après l'infection parasitaire à raison de 50 mg/kg ou 200 mM/kg pour le benznidazole et à la concentration de 5 mg/kg ou 20 mM/kg pour la canthin-6-one. La durée des traitements est fixée à deux semaines et la

5 voie d'administration choisie est la voie orale pour le benznidazole et la canthin-6-one, par ailleurs un groupe de souris est traité avec la canthin-6-one par voie sous cutanée. Les souris non traitées et infectées reçoivent 100 µl d'une solution saline phosphatée tamponnée.

Critères d'évaluation de l'efficacité des traitements :

- comptage hebdomadaire du nombre de parasites circulant dans le sang
- 10 périphérique pendant la durée de l'expérimentation, soit 10 semaines, exprimé par  $10^3$  parasites par ml de sang.
- observation de la mortalité,
  - deux évaluations sérologiques, 40 jours post-infection soit 15 jours après cessation du traitement et 68 jours post-infection soit 45 jours post-traitement.
- 15 L'évaluation sérologique est effectuée à l'aide d'un test ELISA (enzyme linked immunoassay) kit Chagas, IISC, Asuncion, Paraguay. Les densités optiques sont mesurées avec un lecteur de plaques ELISA (Titerek, Unistan, I).

Etudes statistiques : La moyenne et les déviations standard de chaque groupe sont calculées, les différences entre les groupes sont déterminées par le test de

20 Student et le test non-paramétrique d'analyse de variance de Kruskal-Wallis. Les comparaisons s'effectuent entre le groupe non traité et les groupes traités,  $P < 0,05$ .

Les résultats sont exposés dans les tableaux I et II et sur les figures 2, 3 et 4.

TABLEAU I

5 Efficacité de la canthin-6-one, du benznidazole sur des souris infectées expérimentalement avec *Trypanosoma cruzi*  
 Evaluation parastitologique (Moyenne du nombre de parasites,  $10^3$  parasites/ml de sang  $\pm$  Déviation standard)

Jours post-infection	Témoins non traités (n = 8)	Benznidazole (n = 8)	Canthin-6-one Oral (n = 7)	Canthin-6-one Sous cutanée (n = 8)
4	0	0	0	0
11*	91 $\pm$ 257	0	0	0
18*	314 $\pm$ 469	35 $\pm$ 99	286 $\pm$ 516	766 $\pm$ 719
25*	387 $\pm$ 671	250 $\pm$ 503	402 $\pm$ 838	88 $\pm$ 143
32	242 $\pm$ 553	297 $\pm$ 625	426 $\pm$ 664	267 $\pm$ 546
39	870 $\pm$ 1902	118 $\pm$ 193	37 $\pm$ 58	2077 $\pm$ 2214
45	836 $\pm$ 1023	301 $\pm$ 432	34 $\pm$ 77 P=0,05	314 $\pm$ 499
53	1273 $\pm$ 1648	23 $\pm$ 66 P=0,01	58 $\pm$ 81 P=0,05	473 $\pm$ 922
60	1050 $\pm$ 2605	65 $\pm$ 93	16 $\pm$ 36 P<0,05	130 $\pm$ 194
68	1144 $\pm$ 1642	9 $\pm$ 26 P=0,03	0 P=0,02	34 $\pm$ 99 P=0,03

10 \* Période de traitement (deux semaines)  
 n = nombre de souris

15

20

25

TABLEAU II :

5 Effet du traitement avec la canthin-6-one ou du benznidazole sur des souris Pearl Bright infectées avec *T. cruzi*. Evaluation sérologique (test ELISA)

Traitement	Nb Souris	Voie adm.	1 <sup>a</sup> sérologie ®	Sérologie négative/ survivant	2 <sup>a</sup> sérologie ▽	Sérologie négative/ survivant
Témoins non traités (PBS)	8	Oral	0,3985 ± 0,092	0 / 8 (0%)	1,598 ± 0,382	0 / 8 (0%)
Benznidazole (médicament de référence) (50 mg)	8	Oral	0,1692 ± 0,1179 P < 0,001	6/8 (75%)	0,7934 ± 0,8607 P < 0.05	3 / 8 (37,5%)
Canthin-6-one (5 mg)	7	Oral	0,1105 ± 0,0387 P < 0,001	7 / 7 (100%)	0,3953 ± 0,7531 P < 0,05	3 / 7 (42,9%)
Canthine-6-one ( 5 mg)	8	SC	0,1426± 0,1447 P < 0.05	4 / 7 (57,1%)	1,3476 ± 0,6327 P < 0,001	2 / 6 (33,3%)

Sérologie: ELISA anti-*T. cruzi*.

® 40 jours post-infection; 15 jours post-traitement

10 ▽ 68 jours post-infection; 45 jours post-traitement.

Valeur de *P* versus témoins non traités

15 Comme on peut le constater sur la figure 2, la canthin-6-one administrée par voie orale, à une dose de 5 mg/kg/j montre à partir du 39<sup>ème</sup> jour après l'infection parasitaire, et 15 jours après la fin du traitement, une activité bien supérieure au benznidazole employé à la dose de 50 mg/kg/j. Elle induit une éradication totale de *Trypanosoma cruzi* de l'organisme infecté, ce qui ne permet pas d'obtenir le benznidazole. Ces résultats sont confirmés en sérologie par le test ELISA à 15 et 48 jours après la fin du traitement comme cela est illustré sur les figures 3 et 4.

20

## REVENDICATIONS

5 1. Utilisation de la canthin-6-one, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une trypanosomiase.

2. Utilisation de la canthin-6-one, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une trypanosomiase selon la revendication 1, caractérisée en ce que la canthin-6-one est présente sous forme d'un extrait de plante.

10 3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la canthin-6-one est présente sous forme d'un extrait d'une plante choisie parmi : *Ailanthus altissima*, *Brucea antidysenterica*, *Eurycoma harmandiana*, *Peganum nigellastrum*, *Zanthoxylum elephantiasis* et *Zanthoxylum chiloperone*.

4. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la canthin-6-one est présente sous forme d'un extrait de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*.

15 5. Utilisation de la canthin-6-one selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une trypanosomiase dans sa phase chronique et sa phase aiguë.

20 6. Utilisation de la canthin-6-one selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de la maladie de Chagas.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 précédentes, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement d'une trypanosomiase causée par l'agent *Trypanosoma brucei*.

25 8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 précédentes, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement d'une trypanosomiase causée par l'agent *Trypanosoma cruzi*.

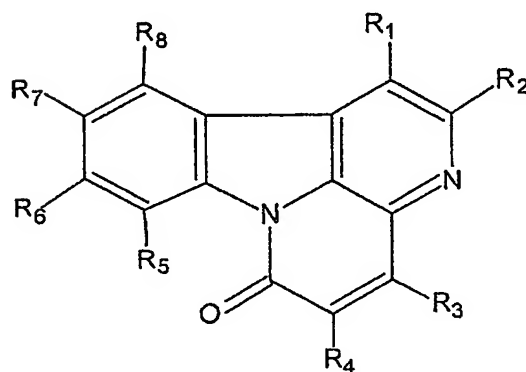
30 9. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'extrait de plante contenant la canthin-6-one est obtenu par un procédé comportant une première étape qui consiste à broyer les écorces séchées du tronc de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* puis à les traiter par une solution alcaline aqueuse.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'extrait de plante contenant la canthin-6-one est obtenue par un procédé comportant une seconde étape consistant en une extraction par un solvant organique chloré.

35 11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 précédentes, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré à une dose comprise entre 0,01 et 100 mg/kg/j de canthin-6-one, de préférence entre 0,1 et 50 mg/kg/j, encore plus préférentiellement entre 1 et 20 mg/kg/j.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré par voie orale.

13. Utilisation d'un dérivé de la canthin-6-one répondant à la formule (I) ci-dessous :



(I)

dans laquelle  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$  représentent indépendamment l'un de l'autre :

- un atome d'hydrogène,
- un groupement alkyle en  $C_1-C_{12}$  linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,
- un atome d'halogène choisi parmi le chlore, le fluor, le brome et l'iode,
- un groupement halogénoalkyle en  $C_1-C_{12}$  dont la chaîne alkyle peut être linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée, et le ou les atomes d'halogène sont choisis parmi le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
- une fonction hydroxyle,
- une fonction nitro  $-NO$
- une fonction cyano  $-CN$
- une fonction  $-SH$
- une fonction acide carboxylique  $-COOH$
- une fonction amide  $-CONH_2$
- une fonction amine  $-NH_2$
- une fonction alcoxy en  $C_1-C_{12}$  dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,
- une fonction ester d'alkyle en  $C_1-C_{12}$ , dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé

- une fonction alkyl amide secondaire ou tertiaire dans laquelle le ou les groupements alkyle en  $C_1-C_{12}$  peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés,
  - une fonction alkylamine secondaire ou tertiaire dans laquelle le ou les groupements alkyle en  $C_1-C_{12}$  peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés,
  - une fonction alkylthio en  $C_1-C_{12}$ , dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,
- pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une
- 10 trypanosomiase.

# Schéma d'extraction des écorces de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae)

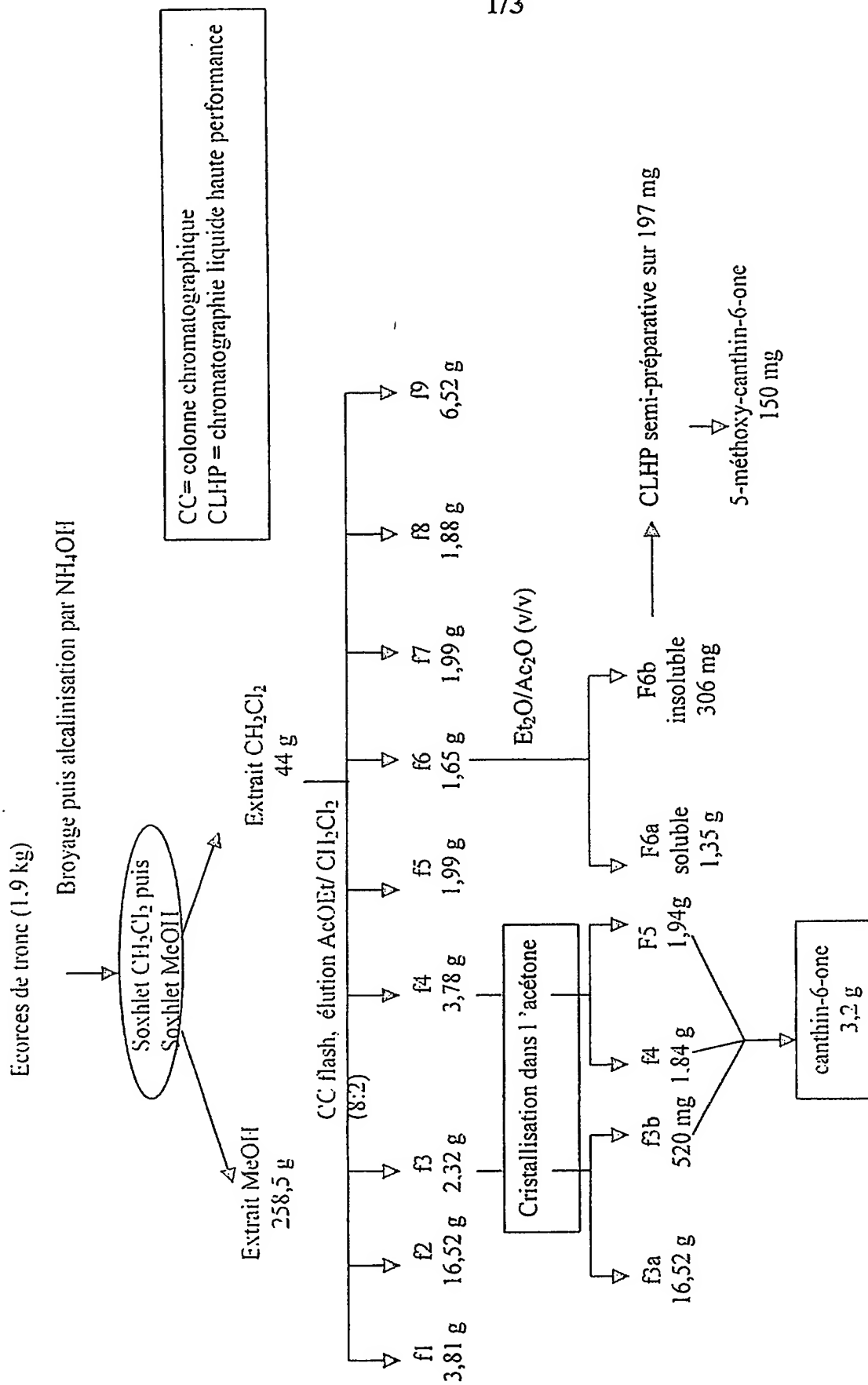


FIGURE 1

# Efficacité de la canthin-6-one, du benznidazole sur des souris infectées expérimentalement avec

*Trypanosoma cruzi*

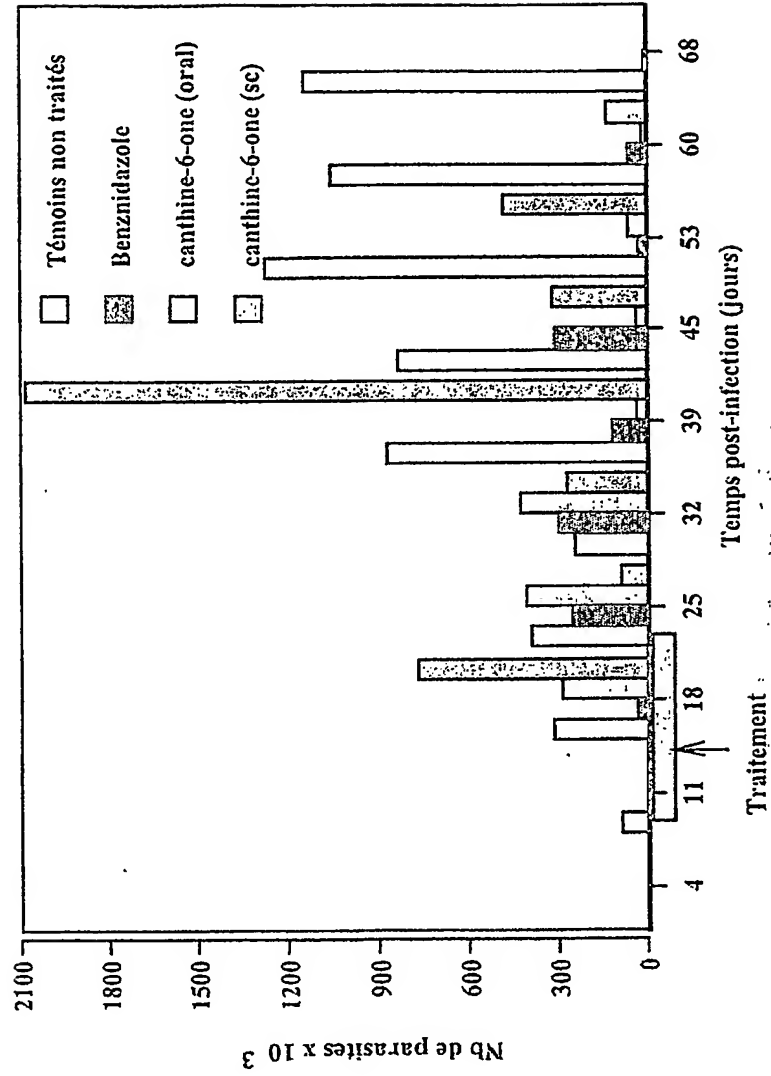


FIGURE 2

Effet du traitement avec la canthin-6-one ou du benznidazole sur des souris Pearl Bright infectées avec *T. cruzi*. Evaluation sérologique (test ELISA)

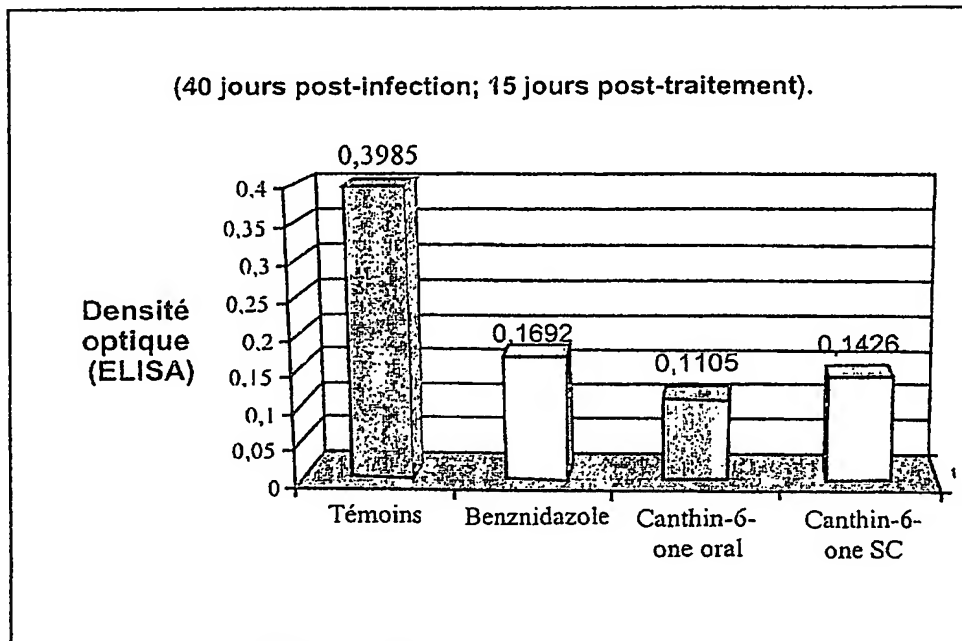


FIGURE 3

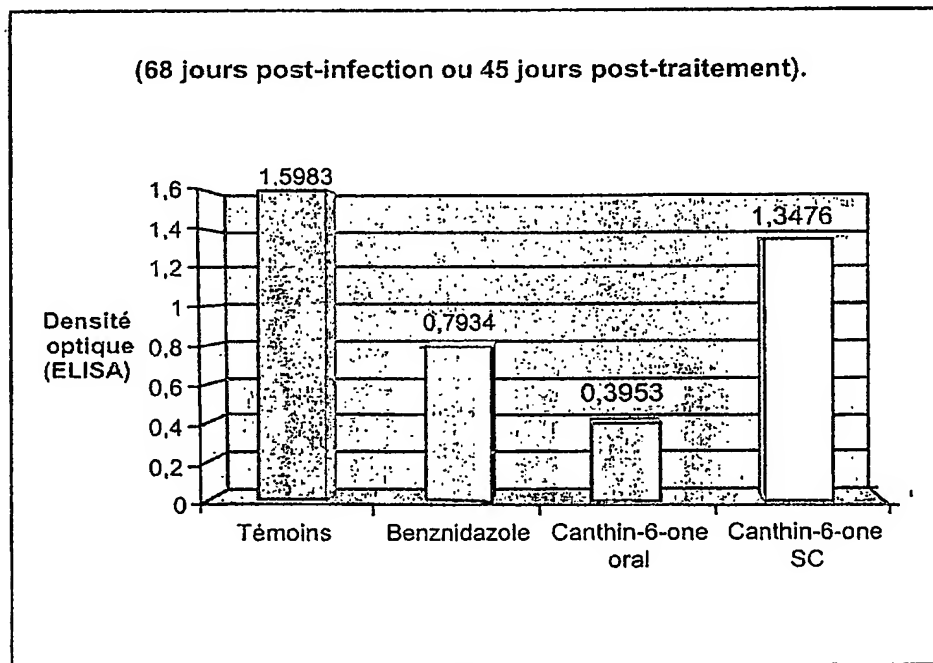


FIGURE 4



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

CS 113 \* W / 20001

Vos références pour ce dossier (facultatif)		VCama-F785/5FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0216729
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE LA CANTHIN-6-ONE, DES EXTRAITS DE PLANTES LA CONTENANT ET DE SES DERIVES DANS LE TRAITEMENT DE LA MALADIE DE CHAGAS.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :  INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT UNIVERSITE NATIONALE D'ASUNCION		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	FÉRREIRA
	Prénoms	Maria Elena
<input type="checkbox"/>	Adresse	Rue
		Juan de Mema C/ Cerro Cora
	Code postal et ville	LUQUE (PARAGUAY)
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	FOURNET
	Prénoms	Alain
<input type="checkbox"/>	Adresse	Rue
		506, Chemin de Tastet
	Code postal et ville	[4 0 2 9 0] OSSAGES
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROJAS DE ARIAS
	Prénoms	Antonieta
<input type="checkbox"/>	Adresse	Rue
		C/ Concordia y Florida
	Code postal et ville	[1 1 6 5] ATILIO PENA (PARAGUAY)
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) Paris, 1e 25 novembre 2002		
DU (DES) DEMANDEUR(S)		
OU DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
ORES Béatrice		
92-4046		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2. / 2.

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

ED 113 W / 770501

Vos références pour ce dossier (facultatif)		VCama-F785/5FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0214729
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
UTILISATION DE LA CANTHIN-6-ONE, DES EXTRAITS DE PLANTES LA CONTENANT ET DE SES DERIVES DANS LE TRAITEMENT DE LA MALADIE DE CHAGAS.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT UNIVERSITE NATIONALE D'ASUNCION		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	HOCQUEMILLER
	Prénoms	Reynald
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
		9, rue d'Arpajon
		19 1 4 7 0 LIMOURS
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input type="checkbox"/> 2	Nom	
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input type="checkbox"/> 3	Nom	
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) Paris, le 25 novembre 2002		
DU (DES) DEMANDEUR(S)		
OU DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
ORES Béatrice		
92-4046		